

DNA Polymerase I (*E. coli*)

Code No. 2130A **Size:** **500 U**
Conc.: **5 U/ μ l**

Supplied Reagent:
10X *E. coli* DNA Polymerase I Buffer 1 ml

Description:

DNA polymerase I, which requires template DNA and primer for its function, selectively catalyzes the transfer of dNTPs to the 3'-OH terminus of a primer that is complementary to the template.¹⁾ This enzyme contains 3' → 5' exonuclease activity specific to single-stranded DNA and 5' → 3' exonuclease activity specific to double-stranded DNA in the same peptide with a MW of 109,000. The enzyme was purified from *E. coli* cells in which *E. coli* DNA polymerase I is cloned.

Storage Buffer:

50 mM Potassium Phosphate, pH 6.5
1 mM DTT
50 % Glycerol

Storage: -20°C

Source:

Escherichia coli carrying the plasmid which encodes the gene of *Pol I*

Unit definition:

One unit is the amount of the enzyme catalyzing the incorporation of 10 nmol of total nucleotides into acid-insoluble products in 30 minutes at 37°C and pH 7.4, with poly d(A-T) as the template-primer.

Reaction mixture for unit definition:

67 mM Potassium Phosphate, pH 7.4
6.7 mM MgCl₂
0.1 mM DTT
20 μ M poly d(A-T)
33 μ M dATP
33 μ M [³H]dTTP

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

1. For nick translation with DNase I⁴⁾ (Cat.#2270A/B).
2. Synthesis of second strand DNA in the Okayama-Berg method⁵⁾ (0.3 μ g of DNA polymerase I corresponds to about 2.5 U).

Note:

1. This enzyme is stable against dilution. However, it may become inactive after being stirred vigorously.
2. It does not have endonuclease activity, and thus it gives rise to little nick translation.
3. Because it has a strong affinity for DNA, an excess may inhibit the reaction because of aggregation of DNA and the enzyme.

Composition of Supplied Reagents (Store at -20°C):

500 mM Tris-HCl, pH 7.8
100 mM MgCl₂
1 mM DTT

* The above buffer has the general composition applicable to nick translation reaction, which is different from that of reaction mixture for unit definition.

Application Example: Nick translation reaction

Prepare the reaction mixture by combining the followings in a tube to the total volume of 40 μ l.

Template DNA	0.05 - 1 μ g
10X <i>E. coli</i> DNA Polymerase I Buffer	4 μ l
dNTP Mixture (0.1 mM dATP, dGTP, dTTP)	4 μ l
111 TBq/mmol [γ - ³² P]dCTP (3,000 Ci/mmol)	10 μ l (3.7 MBq, 100 μ Ci)
DNA Polymerase I (5 U/ μ l)	0.8 μ l
DNase I (0.0004 U/ μ l)	1 μ l
Sterile purified water	up to 40 μ l

- Leave at 15°C for 2 hour
- Heat at 70°C for 5 - 10 min

Use the reactant as hybridization probe. When necessary, remove unincorporated labeled-dCTP through gel filtration or ethanol precipitation.

References:

- 1) Richardson C C, Schildkraut C L, Aposhian H V, and Kornberg A. *J Biol Chem.* (1964) **239**: 222-231.
- 2) Murray N E and Kelley W S. *Molec Gen Genet.* (1979) **175**: 77-87.
- 3) Kelley W S and Stump K H. *J Biol Chem.* (1979) **254**: 3206-3210.
- 4) Rigby P W J, Dickmann M, Rhodes C, and Berg P. *J Mol Biol.* (1977) **113**: 237-251.
- 5) Okayama H and Berg P. *Molec Cell Biol.* (1982) **2**: 161-170.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

DNA Polymerase I (*E. coli*)

Code No. 2130A 容量： 500 U
濃度： 5 U/ μ l

添付試薬：
10 × *E. coli* DNA Polymerase I Buffer 1 ml

●製品説明

本製品は、*E. coli* DNA Polymerase I をクローニングした大腸菌から生産した分子量約 109,000、至適 pH7.4 の酵素である。本酵素は鋳型、プライマー (DNA および RNA とともに可) 存在下で dNTP を基質とし、鋳型に相補的な DNA を 5' → 3' 方向に合成する。また、二本鎖特異的 5' → 3' exonuclease 活性および一本鎖特異的 3' → 5' exonuclease 活性も有している。

●形状

50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5)
1 mM DTT
50 % グリセロール

●保存 - 20°C

●起源

Escherichia coli carrying the plasmid which encodes the gene of *PoI*

●活性の定義

ポリ d (A-T) 合成 DNA を鋳型/プライマーとして用い、37°C、pH7.4 において 30 分間に 10 nmol の全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性を 1 U とする。

●活性測定用反応液組成

67 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)
6.7 mM MgCl₂
0.1 mM DTT
20 μ M ポリ d (A-T)
33 μ M dATP
33 μ M [³H]dTTP

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●用途

1. DNase I (製品コード 2270A/B) との併用によるニックトランスレーション
2. Okayama-Berg 法における second strand DNA 鎖の合成反応 (DNA Polymerase I 0.3 μ g は約 2.5 U に相当する)

●使用上の注意

1. 本酵素は、希釈による活性低下は起こらないが、強く攪拌すると失活することがある。
2. endonuclease を含まないため、単独ではほとんどニックトランスレーション活性を示さない。
3. DNA と強い親和性があるため、過剰に用いると aggregation が起こり、反応が充分進まないことがある。

●添付試薬組成 (保存：- 20°C)

500 mM Tris-HCl (pH7.8)
100 mM MgCl₂
1 mM DTT

※ このバッファー系はニックトランスレーション反応の実験でより一般的な組成となっており、活性測定系とは異なっている。

●使用例

ニックトランスレーション反応

鋳型 DNA	0.05 ~ 1 μ g
10 × <i>E. coli</i> DNA Polymerase I Buffer	4 μ l
dNTP Mixture (0.1 mM dATP, dGTP, dTTP)	4 μ l
111 TBq/mmol [γ - ³² P]dCTP (3,000 Ci/mmol)	10 μ l (3.7 MBq, 100 μ Ci)
DNA Polymerase I (5 U/ μ l)	0.8 μ l
DNase I (0.0004 U/ μ l)	1 μ l
滅菌精製水	up to 40 μ l

↓
15°C, 2 hr.
70°C, 5 ~ 10 min.

そのまま適量をハイブリダイゼーションプロブ液として用いる (必要ならば、ゲルろ過あるいはエタノール沈殿で未反応の標識 dCTP を除去する)。

●参考文献

- 1) Richardson C C, Schildkraut C L, Aposhian H V, and Kornberg A. *J Biol Chem.* (1964) **239**: 222-231.
- 2) Murray N E and Kelley W S. *Molec Gen Genet.* (1979) **175**: 77-87.
- 3) Kelley W S and Stump K H. *J Biol Chem.* (1979) **254**: 3206-3210.
- 4) Rigby P W J, Dickmann M, Rhodes C, and Berg P. *J Mol Biol.* (1977) **113**: 237-251.
- 5) Okayama H and Berg P. *Molec Cell Biol.* (1982) **2**: 161-170.

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。